



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10004973 A**(43) Date of publication of application: **13.01.98**

(51) Int. Cl.

C12N 15/09
A61K 35/76
C07H 21/04
C12N 7/00
//(C12N 7/00 , C12R 1:91)

(21) Application number: **08181513**(22) Date of filing: **20.06.96**

(71) Applicant: **SUMITOMO PHARMACEUT CO**
LTD KOKURITSU
KANSENSHIYOU KENKYUSHO

(72) Inventor: **MATSUURA ZENJI**
SHIYOUJI IKUO
SAITO IZUMI
MIYAMURA TATSUO

(54) RECOMBINED VACUOVIRUS AND ITS
UTILIZATION

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new recombined vacuovirus having a promoter, a recombinase gene, and a poly A sequence, enabling to easily separate and purify an E2A gene-defected recombined adenovirus for generic therapies, and useful for animal cell infections, etc.

SOLUTION: This new recombined vacuovirus has a promoter, a recombinase gene and a poly A sequence. An E2A gene-defected recombined adenovirus for genetic therapies is produced by infecting an animal cell with the recombined vacuovirus and a recombined adenovirus having two recombinase-recognizing sequences directed in the same directions and placed on both the sides of an adenovirus E2A gene region and subsequently cleaving the E2A gene of the recombined adenovirus. the employment of the recombined

vacuovirus enables to easily separate and purify the E2A gene-defected recombined adenovirus. The recombined vacuovirus is obtained by the transfection of a plasmid containing the promoter, the recombinase gene and the poly A sequence to a vacuovirus by a lipofectin method, etc.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-4973

(43)公開日 平成10年(1998) 1月13日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 35/76	A C N		A 6 1 K 35/76	A C N
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 7/00			C 1 2 N 7/00	

// (C 1 2 N 7/00

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-181513

(22)出願日 平成 8 年(1996) 6 月20日

(71)出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号

(71)出願人 591222245

国立感染症研究所

東京都新宿区戸山一丁目23番 1 号

(72)発明者 松浦 善治

埼玉県上福岡市福岡 1 丁目 3 番 5 -406号

(72)発明者 勝二 郁夫

東京都新宿区早稲田鶴巻町543 細谷ビル
201号

(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組換えバキュロウイルス及びその利用

(57)【要約】

【解決手段】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリ A 配列を有する組換えバキュロウイルス、および該組換えバキュロウイルスとアデノウイルス E 2 A 遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた 2 つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換えアデノウイルスを動物細胞に共感染させ、該組換えアデノウイルスの 2 つのリコンビナーゼ認識配列間に存する E 2 A 遺伝子領域を切除することを特徴とする E 2 A 遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法。

【効果】 本発明の組換えバキュロウイルスを使用することにより、目的の組換えアデノウイルスの分離、精製が容易になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルス。

【請求項2】 リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの遺伝子である請求項1記載の組換えバキュロウイルス。

【請求項3】 プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロブリンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である請求項1又は2記載の組換えバキュロウイルス。

【請求項4】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルスと、アデノウイルスE2A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた2つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換えアデノウイルスを動物細胞に共感染させ、該組換えアデノウイルスの2つのリコンビナーゼ認識配列間に存するE2A遺伝子領域を切除することを特徴とするE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法。

【請求項5】 2つのリコンビナーゼ認識配列の挿入部位の一方が、アデノウイルスE2A遺伝子の終止コドンとアデノウイルスL3遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリA付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする請求項4記載の製造方法。

【請求項6】 リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの遺伝子である請求項4又は5記載の製造方法。

【請求項7】 リコンビナーゼ認識配列が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの基質となるloxPのDNA配列(配列番号:1)である請求項4～6いずれか記載の製造方法。

【請求項8】 プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロブリンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である請求項4～7いずれか記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は動物細胞感染用の組換えバキュロウイルス及びその利用に関する。さらに詳しくは、リコンビナーゼ遺伝子発現用組換えバキュロウイルスと該ウイルスを用いた遺伝子治療用組換えアデノウイルスの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】これまで遺伝子導入のウイルスベクターとしてレトロウイルスが良く用いられたが、このウイルスは分裂している細胞にしか導入できないことや宿主細胞の染色体に組み込まれてしまうことにより、特に遺伝

子治療においてはその安全性の観点より問題があり、その応用範囲は限られていると考えられている。アデノウイルスベクターは、種々の動物培養細胞で100%近い導入効率を示すこと、またレトロウイルスと異なり積極的な染色体組み込みの機構を持たないこと、さらに、休止期の細胞でも遺伝子導入出来るという利点もあり、外来遺伝子導入実験のベクターとしての応用範囲は極めて広く、近い将来は遺伝子治療の主要技術の一つとして確立するであろうと考えられている。

10 【0003】アデノウイルスベクターの利用は遺伝子治療技術の一つとして、また神経系などの高度に分化した細胞での発現研究の面で急速に普及してきている。遺伝子治療技術としては、既に構築され機能している組織へ直接投与することにより機能を担っている生細胞へ直接欠損した遺伝子を補う、いわゆるin vivo法として研究が精力的に進められている。既に嚢胞性繊維症では、米国で実際に患者への実験治療が認められており、筋ジストロフィー症、家族性高コレステロール血症、また脳腫瘍等に対して活発に研究されるようになった。

20 【0004】しかし、アデノウイルスベクターはレトロウイルスベクターと異なり、積極的な染色体組み込みの機構を持たないことから、目的遺伝子の発現が一時的である。その期間は1～2週間から、長くて2ヶ月程度である。そのため治療効果を継続させる必要がある場合には、なるべく長期間細胞内でアデノウイルスベクターが安定に存在し、アデノウイルスベクター中に挿入された目的遺伝子が発現し続けることが望ましい。そして、最近、アデノウイルスゲノムのE2A遺伝子の機能を抑制することにより、目的遺伝子の発現期間が延長することがわかってきた(Yangら、Nature Genetics, vol. 7, 362-369(1993))。

30 【0005】一方、本発明者らは、アデノウイルスE2A遺伝子領域とL3遺伝子領域の間に外来ヌクレオチドを導入し得る領域が存在することを発見した。この領域には常法によりそのまま外来ヌクレオチドを導入することができるが、一旦適当なリンカーを常法により導入して必要な制限酵素部位を導入した後、外来ヌクレオチドを導入してもよい。外来ヌクレオチドとしては、動物細胞に感染させた後その細胞内で発現することが望まれるポリペプチドをコードする外来遺伝子でもよく、またその外来ヌクレオチドがそのまま細胞中に共存する酵素の基質となるものであってもよい。さらに、本発明者らは、上記の領域に外来ヌクレオチドとしてリコンビナーゼの認識配列を導入することにより、動物細胞内で発現しうるリコンビナーゼ遺伝子を挿入した動物細胞感染用の組換えアデノウイルスベクターと併用すれば動物細胞内でアデノウイルスゲノムのE2A遺伝子領域を欠失させることができるようなアデノウイルスベクターの系を構築した。

50 【0006】ここに、リコンビナーゼとは、特異的なD

NA組換え酵素で、数十塩基からなる特異的なDNA配列を認識し、この配列間でDNAの切断・鎖の交換と結合の全行程を行う。そこで、この酵素を発現する組換えアデノウイルスベクターと、E2A遺伝子領域の両側にこの認識配列を同じ向きに2コピーを持つ組換えアデノウイルスベクターを作製し、両組換えウイルスを細胞

(例えば、ヒト胎児腎由来の293細胞)に共感染させると、発現したリコンビナーゼにより2つの認識配列間の再構成が起き、挟まれた部分が環状分子として切り出される。従って、こうして得られるE2A遺伝子領域を欠失した組換えアデノウイルスは、E2A遺伝子領域を含む組換えアデノウイルスに比して顕著に安定になり、遺伝子治療に有利に使用できると期待できる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記の方法により得られる目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスを単離するには、最終的にリコンビナーゼ発現組換えアデノウイルスと目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスを分離する操作が必要になる。両者はCsClの密度平衡遠心分離法での分離が可能であるものの、わずかな密度の違いでの分離は高度な技術を要し、目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスを分取する際、リコンビナーゼ発現組換えアデノウイルスが混入するおそれがあった。

【0008】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは上記の問題を解決するために鋭意検討し、ヒト胎児腎由来のアデノウイルスE1AおよびE1Bを発現している293細胞にリコンビナーゼを供給する方法としてバキュロウイルス(AcNPV)ベクターが適していることを見出した。昆虫細胞を宿主とし、バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子発現系は、ウイルスの強力な多角体プロモーターを利用できるため、きわめて効率よく発現産物を生成し、また多くの場合本来の生物活性を保持することができる。また最近、バキュロウイルス(AcNPV)はヒト肝由来細胞には効率良く感染し、種々の外来プロモーターからレポーター遺伝子が効率良く発現するのに対し、他の細胞には感染効率が低いことが明らかにされた(Hofmann C. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 92, 10099-10103, 1995 ; Boyce M.F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2348-2352, 1996)が、本発明者らは、293細胞に対しても十分な感染が見られ、リコンビナーゼ発現組換えバキュロウイルスを感染させた293細胞中で十分量のリコンビナーゼが産生されることを見出した。感染293細胞中では、目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスとリコンビナーゼ発現組換えバキュロウイルスが混在するが、後者は25000×g、60分間の遠心分離により沈澱物として回収された。一方、組換えアデノウイルスは同じ遠心条件で上清画分に存在するため、両ウイルスは簡単に分離するこ

とができ、上記の問題を解決することができた。

【0009】即ち、本発明の要旨は、(1) プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルス、(2) リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの遺伝子である前記(1)記載の組換えバキュロウイルス、(3) プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である前記(1)又は(2)記載の組換えバキュロウイルス、(4) プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルスと、アデノウイルスE2A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた2つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換えアデノウイルスを動物細胞に共感染させ、該組換えアデノウイルスの2つのリコンビナーゼ認識配列間に存するE2A遺伝子領域を切除することを特徴とするE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法、(5) 2つのリコンビナーゼ認識配列の挿入部位の一方が、アデノウイルスE2A遺伝子の終止コドンとアデノウイルスL3遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリA付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする前記(4)記載の製造方法、(6) リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの遺伝子である前記(4)又は(5)記載の製造方法、(7) リコンビナーゼ認識配列が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの基質となるloxPのDNA配列(配列番号:1)である前記(4)～(6)いずれか記載の製造方法、(8) プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である前記(4)～(7)いずれか記載の製造方法、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】昆虫に感染して病気を起こすウイルスであるバキュロウイルスは、環状の二本鎖DNAを遺伝子としてもつエンベロープウイルスで、鱗翅目、膜翅目および双翅目などの昆虫に感受性を示す。バキュロウイルスの中で、感染細胞の核内に多角体(ポリヒドラ)と呼ばれる封入体を大量につくる一群のウイルスが核多角体病ウイルス(NPV)である。多角体は、分子量31kDaのポリヘドリンタンパクより構成され、感染後期に大量につくられその中に多数のウイルス粒子を埋め込んでいる。多角体はウイルスが自然界で生存するためには必須であるが、ウイルスの増殖そのものには必要ないので、多角体遺伝子の代わりに発現させたい外来遺伝子を挿入してもウイルスは全く支障なく感染し増殖

する。

【0011】本発明で用いられるバキュロウイルスは、NPVのキンウバ亜科のオートグラフ カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPV (AcNPV) やカイコのボンビックス モリ (*Bombyx mori*) NPV (BmNPV) の2つのウイルスがベクターとして主に用いられ、それぞれウイルスの感染、継代細胞として、スポドプテラ フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞 (Sf細胞)、BmN4細胞などが入手、購入可能である。Sf細胞は、BmN4細胞などに比べ増殖速度が速いこと、また、AcNPVはヒト肝細胞およびヒト胎児腎細胞などにも感染する能力を有することから、AcNPV系のベクターが好ましい。AcNPV系のトランスファーベクターとして、本発明者らは、pAcYM1 (Matsuura, Yら, J. Gen. Virol., 68, 1233-1250, 1987) (図6) を利用した。他の多くのベクターは、NERCウイルス研究所 (オックスフォード、UK) のポッセ博士 (Dr. R. D. Possee) より入手可能である。組換えバキュロウイルス作製のためのウイルスDNAは、野生型ウイルスまたはLacZ遺伝子を組み込んだウイルス (図7) のいずれでも構わないが、組換えバキュロウイルスの識別の容易さにより、LacZ遺伝子を組み込んだウイルスが好ましい。

【0012】本発明に用いられるアデノウイルスは、動物を自然宿主とするものであり、特にヒトを宿主とするヒトアデノウイルスが好適に用いられる。ヒトアデノウイルスのゲノムは、約36kbpの2本鎖線状DNAであって、DNA鎖両端にはおよそ100bpからなる逆方向反復塩基配列があり、そのDNA鎖両端の5'末端にはE2B遺伝子産物が切断加工された55kのタンパク質が共有結合しているという特異な構造をしている。

【0013】本発明に用いられるアデノウイルスのゲノムは、E1遺伝子領域特にE1A遺伝子領域を欠失していることが好ましい。これは、アデノウイルスの細胞ガン化活性に関与するE1A遺伝子領域を欠失させることにより、アデノウイルスを無毒化し、ゲノム中に組み込んだ外来の遺伝子配列のみを発現させるためである。必ずしもE1A遺伝子領域の全てを欠失させる必要はないが、例えば1.3~9.3%の断片を除去すれば、目的は達成される。このようにE1遺伝子領域を欠失しているアデノウイルスは、ヒト胎児腎由来細胞株293細胞のようなE1A、E1B遺伝子を持続的に発現している細胞株を除き、宿主細胞内で増殖することができないという特徴を有する。また、本発明に用いられるアデノウイルスのゲノムは、E3遺伝子領域を欠失させてもよい。特に、E3遺伝子領域の7.6~84.8%を欠失させたものが好ましい。アデノウイルスの複製には不要であるからである。

【0014】ところで、実際にヒトや動物に投与した場合、E1A蛋白と同様の機能を有する蛋白が細胞中に存

在し、これによりわずかにアデノウイルス蛋白が発現する。これが細胞免疫を引起し、ウイルスDNAを保持する細胞が攻撃を受け排除されることがわかっている。現在使用されているE1A、E1B欠損型アデノウイルスベクターによる遺伝子発現が短期間である原因はここにある。これを防ぐためには、E2A遺伝子の機能を欠失させることが有効であることがYangらにより明らかにされた (Nature Genetics, vol.7, 362-369, 1993)。これは、温度感受性のE2A遺伝子変異株を利用したものであるが、動物に投与した場合、E2A遺伝子の機能発現が抑制されるものの機能発現を完全に止めることができない。E2A遺伝子の機能発現を完全に止める手段としてはE2A遺伝子領域を欠失させることが考えられる。

【0015】本発明は、E2A遺伝子の両端にリコンビナーゼ認識配列を配置した組換えアデノウイルスとリコンビナーゼ発現用バキュロウイルスを動物培養細胞に共感染させ、細胞内で発現したリコンビナーゼによりE2A遺伝子欠失型感染性ウイルス粒子を作製するというものである。得られるE2A遺伝子欠失型ウイルスはE2A遺伝子の発現が皆無であるため、目的とする遺伝子の発現期間が大幅に延長することは間違いない。

【0016】リコンビナーゼの認識配列の挿入位置は、E2A遺伝子領域の右側 (図1参照) すなわちE3領域内には従来から知られている領域があるが、E2A遺伝子領域の左側については、E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝子の終止コドンの間であって、得られる組換えアデノウイルスの増殖を阻害しない部位が選択される。E2A遺伝子領域やL3遺伝子領域の一部欠失あるいはポリA付加シグナル領域が一部欠失することになると、得られる組換えアデノウイルスの増殖が阻害されるため好ましくない。

【0017】本発明に用いられるプロモーターとしては、動物ウイルス遺伝子プロモーターおよび動物細胞遺伝子プロモーターが挙げられる。前者の例としてはSV40遺伝子プロモーター、アデノウイルス主要後期遺伝子プロモーター、等があり、また、後者の例としては、チミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、メタロチオネイン遺伝子プロモーター、免疫グロブリン遺伝子プロモーター等がある。しかし本発明には、CAGプロモーターが特に有利に用いられる。このプロモーターは、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクトチンプロモーター、ウサギβグロブリンのスプライシングアクセプターおよびウサギβグロブリン由来のポリA配列からなるハイブリッドプロモーターであり、高発現ベクターとして特開平3-168087号公報に開示されている。その調製は同公報に記載されているpCAGGS (特開平3-168087、13頁20行~20頁14行および22頁1行~25頁6行) から制限酵素SalI、HindIIIで切り出すことにより行うことができ、本発

明に利用することができる。

【0018】本発明に用いられるリコンビナーゼは、特異的なDNA組換え酵素で、特定の塩基配列を認識し、この配列間でDNAの切断、鎖の交換と結合の全行程を行う。かかる酵素としては、大腸菌のバクテリオファージP1がコードするもの（リコンビナーゼCre）がある。これはバクテリオファージP1内のloxP（Abremskiら、J. Biol. Chem. 1984、1509-1514；およびHoeslら、P.N.A.S.、1984、81、1026-1029）配列を基質とする。即ち、loxP配列がリコンビナーゼCreの認識配列となる。また、他のリコンビナーゼとして酵母の2μプラスミド由来のFLP遺伝子がコードするリコンビナーゼが挙げられる（James R. Broachら、Cell、29、227-234）。さらに、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のものも使用できる。これはR遺伝子にコードされる（Matsuzakiら、Molecular and Cellular Biology、8、955-962（1988））。これらの中では、バクテリオファージP1のリコンビナーゼが本発明に特に好適である。

【0019】リコンビナーゼ遺伝子は、例えば、リコンビナーゼCre遺伝子の場合、バクテリオファージP1のDNAのリコンビナーゼ遺伝子をコードする部分をポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法を用いて増幅して本発明に使用することができる。その他のリコンビナーゼ遺伝子の場合も同様にPCR法を用いて調製することができる。この場合に使用するプライマーは、リコンビナーゼ遺伝子の全配列がカバーされるように選択され、さらに組換えバキュロウイルスベクターの構築の便宜のため、各プライマーの外側に適当な制限酵素切断配列を付加したものを使用することが好ましい。

【0020】上記のリコンビナーゼの認識配列（基質となる配列）は数十bpであり、例えばloxP配列は34bpであり、全て、塩基配列が知られているので（Abremskiら、J. Biol. Chem. 1984、1509-1514；およびHoeslら、P.N.A.S.、1984、81、1026-1029）、常法により化学合成して本発明に使用することができる。

【0021】本発明に用いられるポリA配列としては、特に限定されるものではないが、ウサギβグロビン由来のものが特に好ましい。

【0022】本発明においては、リコンビナーゼ遺伝子をバキュロウイルスベクターに組み込む場合に、同時に核移行シグナル配列を組み込むことが好ましい。例えば、SV40の核移行シグナルが利用できる。これは、バキュロウイルスベクターにより感染細胞の細胞質内で発現したリコンビナーゼがその認識配列を有するアデノウイルスベクターに作用するには、核内に移行する必要がある、核移行シグナル配列はこれを促進する（Daniel Kalderonら、Cell. 39、499-509（1984））からである。

【0023】本発明に使用される外来遺伝子としては、上記のハイブリッドプロモーター（CAGプロモーター）あるいはその他のプロモーターにより発現することができる遺伝子であれば、特に限定されるものではなく、有用性の観点から、ヒトの欠損遺伝子に対応する正常遺伝子の配列（例えばアデノシンデアミナーゼ、ジストロフィン、低密度リポ蛋白レセプター、α-1アンチトリプシン、血液凝固第8因子、血液凝固第9因子、ガラクトシダーゼα、もしくはβ）、サイトカイン類（例えばインターロイキン-1～12、インターフェロンα、βもしくはγ、腫瘍壊死因子αもしくはβ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、成長ホルモン、インシュリン、インシュリン様成長ホルモン）、神経栄養因子類、非自己抗原遺伝子（例えばアロHLA（HLA-B7））、ウィルス抗原等をコードするヌクレオチド配列、ガン抑制遺伝子（例えば、p53、RB、WT-1、NM23、NF-1）、ガン遺伝子であるRas等のアンチセンス配列、またはチミジンキナーゼやシトシンデアミナーゼのような自殺遺伝子と呼ばれるものが挙げられる。

【0024】本発明の組換えアデノウイルスベクターに組み込まれるプロモーター、外来遺伝子およびポリA配列は上流からこの順に配向していても逆の順に配向していてもよい。本発明において、組換えバキュロウイルスと組換えアデノウイルスを共感染させる動物細胞としては、ヒト、マウス、ラット等の哺乳類由来の細胞が挙げられ、両ウイルスが効率よく感染する細胞が用いられる。E1遺伝子欠失組換えアデノウイルスを用いる場合には、E1A、E1B遺伝子を持続的に発現している動物細胞が好ましく、例えば293細胞が挙げられる。

【0025】次に、本発明の組換えアデノウイルスの製造方法について説明する。

(1) まず、E2A遺伝子領域の両側にある同方向を向いた二つのリコンビナーゼ認識配列、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を有する組換えアデノウイルスの製造方法について述べる。便宜上、リコンビナーゼとしてはリコンビナーゼCreを、その認識配列としてはloxPを、プロモーターおよびポリA配列としては前記のCAGプロモーターを、外来遺伝子としてはlacZ遺伝子を使用する場合について述べるが、その他のリコンビナーゼ、その認識配列、プロモーターおよびポリA配列を使用する場合も実質的に同様の手法を利用することができる。

【0026】(a) (pAdex1CAwtの構築)

① CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31の構築

CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS（Niwaら、Gene、108、193-200（1990））をEcoRIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、Swai

リンカーとのリガーゼ反応を行う。次に、得られたプラスミドをSal Iで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、Cla Iリンカーとのリガーゼ反応を行う。さらに、得られたプラスミドをPst Iで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、Xho Iリンカーとのリガーゼ反応を行い、CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31を取得する。元の制限酵素部位の消失および各リンカーの挿入は各制限酵素切断の後、アガロースゲル電気泳動により確認する。

【0027】② pAdex1cの構築

E1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の17%を含むプラスミド(pUAF0-17D)、5型アデノウイルスDNAにBamHIリンカーを結合させた後HindIII消化して得られるフラグメント(2.8kb、アデノウイルスゲノムの左側末端の8%に当たる)をpUC19に挿入して得られるプラスミド(pUAF0-8)、およびアデノウイルスDNAをHindIII消化して得られる3.4kbフラグメント(アデノウイルスゲノムの左側末端の8-17%に当たる)をpUC19のHindIII部位へ挿入して得られるプラスミド(pUAF8-17)とを調製し、ついでpUAF0-8由来の454bpのBamHI-Cla Iフラグメントと、pUAF8-17由来の2.9kbのHindIII-Cla Iフラグメントをつなぎ、pUC19のBamHI/HindIII部位へ挿入してpUAF0-17Dを得る。

【0028】さらに、5型アデノウイルスDNAをBst1107とEcoRIで消化し21.6kbのフラグメントを得る。また、アデノウイルスゲノム由来のpX2WのEcoRI-Sal Iフラグメント(6.5kb)を調製する。一方、charomid9-11(I. Saito & G. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 83, p8664-8668, 1986)をAsp718とBamHIで消化し、Klenow酵素で平滑化後、セルフライゲーションする。ついでそのEcoRI部位へBamHIリンカーを挿入し、シャロミドをchdRBR7-11を調製する。

【0029】上記のpUAF0-17DのBamHI-Bst1107フラグメント(2.9kb)とアデノウイルスゲノムのBst1107-EcoRIフラグメント(21.6kb)とpX2WのEcoRI-Swa Iフラグメント(6.5kb)をEcoRIとEcl36Iで消化したchdRBR7-11とライゲーションする。その後、in vitroパッケージングし、DH5αへ感染させる。形質転換株から目的のフラグメントをもつものを単離し、pAdex1cと名づける。

【0030】③ カセットコスミドpAdex1cwの構築

Cla Iで切断した後エタノール沈澱により回収したpAdex1cと、5'末端リン酸化を施した下記の合成

リンカー(1)(配列番号:2)(Swal、Cla I、Sal I、Nru I部位を含む)を混合し、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、Swalで消化する。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからSwal断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行う。次に、反応液をSpuncolumn(Pharmacia社製)にかけ、リンカー由来の小断片を除去した後、T4DNAリガーゼでライゲーションを行い、セルフアニーリングによる環状化を行う。ついでイン・ビトロ・パッケージングを行い、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamHIおよびNru I同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合483bp、逆方向に挿入された場合、464bpの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdex1cw(図1)を取得する。

合成リンカー

- (1) 5'-CGATTAAATCGATTGTCGACTCGCGA-3'
3'-TAAATTAGCTAACAGCTGAGCGCTGC-5'

【0031】④ カセットコスミドpAdex1pCAwの構築

①で構築したプラスミドpCMwCH31をHindII IおよびCla Iで同時消化し、Klenow酵素により平滑化し、5'末端リン酸化を施したPme Iリンカーとのライゲーションを行う。リガーゼを熱失活させた後、Psp1406Iで消化する。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからPsp1406I断片を切り出し、リンカーがDNA断片の両端にそれぞれ1個連結した構造の断片を得るために行う。このあと、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、2.3kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。次に、pAdex1cwをCla Iで切断した後、生じた小断片をSpuncolumn(Pharmacia製)により除去した後のDNA断片と前述の2.3kbのDNA断片をT4DNAリガーゼでライゲーションさせる。リガーゼを熱失活させた後、Cla Iを添加し、セルフアニーリングにより生じた環状コスミドを切断する。ついで、イン・ビトロ・パッケージングに用いる。

【0032】更に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamHIおよびXho I同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合483bpと4.8kb、逆方向に挿入された場合、2.7及び2.5kbの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdex1pCAwを取得する。

【0033】⑤ カセットコスミドpAdex1CAw(細胞工学、Vol.13、No.8、P759)の構築
Swalで切断した後エタノール沈澱により回収したpAdex1pCAwを、5'末端リン酸化を施した下記の

合成リンカー (2) (配列番号: 3) (C l a I、X b a I、S p e I、P a c I、S w a I、C l a I部位を含む) を混合し、ATP、T 4 DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、P a c I (20 unit) を添加し、反応させる。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからP a c I断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行う。次に、反応液をS p u n c o l u m n (P h a r m a c i a 製) にかけて、リンカー由来の小断片を除去した後、T 4 DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させ、セルフアニーリングによる環状化を行う。リガーゼを熱失活させた後、イン・ビトロ・パッケージングに用いる。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をX b a IおよびX h o I同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合552bp、逆方向に挿入された場合、568bpの断片を生じる。これを確認することにより目的とするカセットコスミドp A d e x l C A w t (図2) を取得する。

合成リンカーの構造

(2) 5'-ATCGATTCTAGACTAGTTTAATTAATTTAAATCGAT-3'
3'-TAGCTAAGATCTGATCAAAATTAATTAATTTAGCTA-5'

【0034】(b) (l o x P挿入コスミドの構築その1)

p A d e x 2 L 3 L C A w t の作製

① p A 6 0 X 9 9 X の作製

p A d e x l C A w t をB a m H I で切断した後、熱処理によりB a m H I を失活させる。次にT 4 DNAリガーゼにより一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5α (G I B C O B R L 製) を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドp A 6 0 X 9 9 X を得る。

【0035】② p A 6 0 X 9 9 の作製 (アデノウイルス以外のX b a I部位の除去)

p A 6 0 X 9 9 X をX b a I 処理し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、2ヶ所のX b a I部位のうち1ヶ所のみで切断された23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。次に、この断片をK l e n o w 酵素 (宝酒造製) で両末端を平滑化し、T 4 DNAリガーゼで一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。これらのプラスミドDNAをB s r G I およびX b a I で同時消化し、6.2kbの断片すなわちプラスミドp A 6 0 X 9 9 (図3) を得る。

【0036】③ p A 2 L 6 0 X 9 9 の作製 (B s r G I 部位へのl o x Pの挿入)

p U L L 2 r をX h o I で切断した後、K l e n o w 酵素 (宝酒造製) で両末端を平滑化する。その後フェノール:クロロホルム (1:1) 処理を施した後、エタノール

ル沈澱する。沈澱物を遠心分離により取得し、T E 6 0 μ l に溶解する。これと5'末端リン酸化K p n I リンカー (宝酒造製)、ATPおよびT 4 DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液 (最終容量50μl) 中で一晩結合させる。次に、A s p 7 1 8 (ベーリングー製) で消化する。反応混液をアガロースゲル電気泳動し、l o x Pを含む64bpのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。

【0037】なお、上記のp U L L 2 r は以下のようにして調製する。p U C 1 1 9 (宝酒造製) を制限酵素E c l 1 3 6 I I で切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した後、末端にM l u I 部位およびX h o I 部位を有しこれが連結するとN r u I 部位を生じるように設計されているl o x P配列を含む下記の合成DNA断片 (配列番号: 4) とのligation反応を行い該合成DNA断片が2つ挿入されたプラスミドp U L L 2 r を得る。

5'-CGAACGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCG
AGTCG-3'

3'-GCTTGCGCATATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATAGAGC

20 TCAGC-5'

(下線部分の配列がl o x P部位である。)

【0038】一方、プラスミドp A 6 0 X 9 9 (10μg) をB s r G I (50 unit) を含む反応系50μl 中で切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。このDNA断片と前述のl o x Pを含む64bpのDNA断片、ATPおよびT 4 DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液中で一晩結合させる。これに滅菌水、B s r G I 反応b u f f e r を加え、70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、B s r G I で処理してセルフアニーリングにより生じた環状のp A 6 0 X 9 9 を切断する。次いでこの反応混液10μl を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。

【0039】挿入されたl o x Pの方向を確認するため、A p a I とM l u I の同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動する。目的とする方向に挿入された場合、366および219bp、逆方向に挿入された場合、334および251bpの断片が生じる。また、N r u I で消化した場合、目的とする方向に挿入された場合573bp、逆方向に挿入された場合、533bpの断片が生じる。さらに、D r a I とK p n I で同時消化した場合、目的とする方向にl o x Pが1つ挿入された場合320bp、2つ挿入された場合、384bpの断片が生じる。これら3種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向にl o x Pが1つ挿入された目的のプラスミドp A 2 L 6 0 X 9 9 (図4) を取得する。

50 【0040】④ p A 2 L 3 L 6 0 9 9 の作製 (X b a

I 部位へのloxPの挿入)

pULL2rをXhoIを含む反応系100μl中で切断した後、Klenow酵素(宝酒造製)で両末端を平滑化する。ついで、フェノール:クロロホルム(1:1)処理を施した後、エタノール沈澱する。沈澱物を遠心分離により取得し、TEに溶解する。これと5'末端リン酸化SpeIリンカー(宝酒造製)、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。さらに、SpeIを加え消化した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、loxPを含む64bpのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。

【0041】一方、pA2L60X99を、XbaIで切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNAを回収する。このDNA断片と前述のloxPを含む64bpのDNA断片、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させ、ついでこれをXbaIで処理し、セルフアニーリングにより生じた環状のpA2L60X99を切断する。この反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。

【0042】挿入されたloxPの方向を確認するため、BglIIとMluIの同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動する。目的とする方向に挿入された場合、366および503bp、逆方向に挿入された場合、398および471bpの断片が生じる。また、ApaIとMluIで同時消化した場合、目的とする方向に挿入された場合660bp、逆方向に挿入された場合、628bpの断片が生じる。EcoNIとMluIで消化した場合、目的とする方向に挿入された場合311bp、逆方向に挿入された場合、343bpの断片が生じる。さらに、HpaIとSacIで同時消化した場合、目的とする方向にloxPが1つ挿入された場合397bp、2つ挿入された場合、461bpの断片が生じる。これら4種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向にloxPが1つ挿入された目的のプラスミドpA2L3L6099(図5)を取得する。

【0043】⑤ pAdex2L3LCAwtの作製
pAdex1CAwtを、Csp45I(東洋紡製)で切断し、次いで、同反応液中でBamHI、さらにEcoRIで切断した後、アガロースゲル電気泳動によるチェックを行う。21kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。なお、Csp45IおよびEcoRIによる切断は21kbのBamHIDNA断片を回収する際、他の断片が混入するのを防ぐためである。

【0044】pA2L3L6099をBamHIで切断した後、フェノール:クロロホルム(1:1)処理を施

し、水層をTEで平衡化したSephadexG25によりゲル濾過する。回収したDNA断片と前述の21kbのDNA断片、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、これをイン・ビトロ・パッケージングに用いる。

【0045】即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバックXL(Stratagene製)を用い、残りは-80℃に凍結する。ギガバックXLは42kb以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなったコスミドをある程度選択することができる。本発明では、10個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的のクローン(ウイルスゲノムが正しく連結されたクローン)を容易に得ることができる。コスミドの扱い方については、常法(斎藤 泉他、実験医学:7:183-187, 1989)に従って行う。

【0046】パッケージングされたコスミドを大腸菌DH5α(GibcoBRL製)に感染させる。即ち、Ap^r(アンピシリン添加)寒天プレートとAp^rLB(pool)に各種の濃度で接種し、一晩培養する。poolのminiprepDNAを抽出・調製し、制限酵素DraI切断によりインサートがはいったものの割合を調べる。コロニーは丸ごと寒天ごと取りAp^rLBで一晩培養し、miniprepDNAを調製する。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をDraI切断により確認する。目的とする方向に挿入された場合891bp、逆方向に挿入された場合1.4kbの断片を生じる。これにより目的とするカセットコスミドpAdex2L3LCAwtを取得する。

【0047】(c) (loxP挿入コスミドの構築その2)

pAdex2LA3LCAwtの作製

① pUCA6065の作製

pA60X99をBamHIおよびPstIにより切断し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、BsrGI部位を含む1.7kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。同様の操作によりpUC19をBamHIおよびPstIにより切断し、2.7kbの断片を回収する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpUCA6065を得る。

【0048】② p2LA6065の作製

pUCA6065をBamHIおよびAflIIIで切断し、780bpの断片を調製し、また、同プラスミドをBamHIおよびBsrGIで切断し、3.6kbの断片を調製する。これら両断片とloxP配列を含む下記のリンカーDNA(配列番号:5)を混合しリガーゼ反

応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晚結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、リンカーDNAが1つ挿入された、目的とするプラスミドp2LA6065を得る。

5'-CATGTAATTT AAATCTCGAG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTA
TACGAAG TTATACGCGT

3'-ATTAAA TTTAGAGCTC TATTGAAGCA TATTACATAC GATATGC
TTC AATATGCGCA

ATTTAAATGT AAAATAATG TACTAGAGAC ACTTTCAATA AAGGCA
AATG CTTTTATTT-3'

TAAATTTACA TTTTATTAC ATGATCTCTG TGAAAGTTAT TTCCGT
TTAC GAAAATAAAC ATG-5'

【0049】③ pA2LA3L6099の作製
p2LA6065をBamHIおよびSfiI（あるいはBglI）により切断し、1.5kbの断片を調製する。また、pA2L3L6099をBamHIおよびSfiIにより切断し、約2.2kbの断片を調製する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晚結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA2LA3L6099を得る。

【0050】④ pAdex2LA3LCAwTの作製
pAdex2L3LCAwT作製の際の⑤と同様の操作により、pA2LA3L6099とpAdex1CAwTからpAdex2LA3LCAwTを作製する。

【0051】(d) (loxP挿入コスミドの構築その3)

pAdex2LD3LCAwTの作製

① pHSGA6065の作製

pA60X99をBamHIおよびPstIにより切断し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、BsrGI部位を含む1.7kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。pHSG299（宝酒造）をBamHIおよびPstIにより切断し、同様の操作により2.7kbの断片を回収する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晚結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpHSGA6065を得る。

【0052】② p2LD6065の作製

pHSGA6065をBsrGIおよびDraIで切断し4.4kbの断片を調製し、これとloxP配列を含む下記のリンカーDNA（配列番号：6）を混合し、リガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4

DNAリガーゼを加え、一晚結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、リンカーDNAが1つ挿入された目的とするプラスミドp2LD6065を得る。

5'-GTACACTCTC GGGTGATTAT TTACCCAC CCTTGCCGTC TGC
GCCGATT TAAATCTCGA

3'-TGAGAG CCCACTAATA AATGGGGGTG GGAACGGCAG ACGCGGC
TAA ATTTAGAGCT

10 GATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTATACGCG TATTTA
AATC CGTTT-3'

CTATTGAAGC ATATTACATA CGATATGCTT CAATATGCGC ATAAAT
TTAG GCAAA-5'

【0053】③ pA2LD3L6099の作製

p2LD6065をBamHIおよびSfiI（あるいはBglI）により切断し1.5kbの断片を調製する。また、pA2L3L6099をBamHIおよびSfiIにより切断し、約2.2kbの断片を調製する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晚結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA2LD3L6099を得る。

【0054】④ pAdex2LD3LCAwTの作製
pAdex2L3LCAwT作製の際の⑤と同様の操作により、pA2LD3L6099とpAdex1CAwTからpAdex2LD3LCAwTを作製する。

【0055】(e) アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体 (Ad5 dIX DNA-TPCおよびAdex1CANLacZ DNA-TPC) の調製

アデノウイルスDNAとしては、Ad5 dIX (I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (1985)) またはAdex1CANLacZを用いる。Ad5 dIXをHeLa細胞 (Roux 10本分) に、Adex1CANLacZを293細胞にそれぞれ感染させ、培養を行う。調製方法は、特開平8-84589号公報 (14欄8行～15欄8行) に記載されている。得られたAd5dIX DNA-TPCまたはAdex1CANLacZ DNA-TPCを、次のステップのloxP挿入組換えアデノウイルス作成のため、充分量のAgeIで2時間切断し、Sephadex G25カラムでゲル濾過後、-80℃に保存する。

【0056】(f) loxP挿入組み換えアデノウイルスの作製

なお、NLacZは大腸菌LacZ遺伝子のN末端にSV40の核移行シグナルを付加したものである。

① 10% FCS添加DMEで培養した293細胞の6cm、10cmシャーレ各1枚用意する。

②-1. (Ad5dIX2L3LまたはAdex2L3

LCANLacZの作製)

発現ユニットを組み込んだloxPを挿入したコスミドpAdex2L3LCAwt DNAの8μgとAgeIで切断したAd5d1X DNA-TPCまたはAgeIで切断したAdex1CANLacZ DNA-TPCの1μgを混合し、セルフエクト(ファルマシア製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。

【0057】②-2. (Ad5d1X2LA3LまたはAdex2LA3LCANLacZの作製)

発現ユニットを組み込んだloxPを挿入したコスミドpAdex2LA3LCAwt DNAの8μgとAgeIで切断したAd5d1X DNA-TPCまたはAgeIで切断したAdex1CANLacZ DNA-TPCの1μgを混合し、セルフエクト(ファルマシア製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。

【0058】②-3. (Ad5d1X2LD3LまたはAdex2LD3LCANLacZの作製)

発現ユニットを組み込んだloxPを挿入したコスミドpAdex2LD3LCAwt DNAの8μgとAgeIで切断したAd5d1X DNA-TPCまたはAgeIで切断したAdex1CANLacZ DNA-TPCの1μgを混合し、セルフエクト(ファルマシア製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。

【0059】③ ②-1~②-3の組換えウイルスの分離と高力価ウイルス液の作製は、特開平8-84589号15欄36行~16欄35行に記載の方法に従う。ただし、判定期間を15~25日に変更したことを除く。

【0060】ここで得られるloxP挿入組換えアデノウイルスAd5d1X2L3L、Ad5d1X2LA3L、Ad5d1X2LD3L等と、目的の外来遺伝子発現ユニットを含むコスミドを用いて、公知の組換えアデノウイルス作製方法、例えばCOS-TPC法(「実験医学別冊」バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社(1994)、43~58頁)に従って、目的の外来遺伝子発現ユニットとloxPが挿入された組換えアデノウイルスを作製することができる。

【0061】(2) 次に、プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルスの製造方法について説明する。以下に、リコンビナーゼ遺伝子としてリコンビナーゼCre遺伝子を使用した場合について述べるが、他のリコンビナーゼ遺伝子の場合もほぼ同様である。

【0062】① 特開平8-84589号12欄18行~14欄7行に記載の方法により、CAGプロモーターのクロニング部位にCre遺伝子を挿入したカセットコスミドを作製し、制限酵素PmeIで消化し発現ユニ

ットを含む断片を回収する。ベクターpAcYM1をEcoRVとBamHIで消化しポリヘドリンプロモーター領域を取り除き、Klenow酵素を用いて平滑化し、さらにアルカリフォスファターゼ処理を施した後、前述の断片と混合し、T4 DNAリガーゼで結合させ、この反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドを得る。

② 前記プラスミドと直鎖状バキュロウイルスDNAを混合して、リポフェクション法によりSf細胞にトランスフェクションし、3日後の上清を適当に希釈してプラークアッセイする。プラークアッセイを繰り返すことにより、純化したクローンを得る。

③ 純化したウイルスクローンを次第にスケールアップして増やし、高い感染価のストックを調製する。次に、ショ糖密度勾配遠心分離法により目的のCre発現用組換えバキュロウイルスを精製する。

(3) 最後に、E2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法について説明する。

① (1)-③および(2)-③のウイルスをそれぞれmoi=10および100で293細胞に感染させ、培養を行う。4日めに細胞を回収し、前述の方法によりDNAを回収する。

② loxPで挟まれた領域(E2A遺伝子を含む)が切り出された構造を有するAdexd123CANLacZの生成を次の方法で確認する。回収したDNAをSmaI消化の後、ゲル電気泳動し、loxPで挟まれた領域が切り出されて生じる4.7kbのバンドとAdex2L3LCANLacZ、およびAdexd123CANLacZにおいて共通して見られる4.45kbのバンドの濃さの比較から、回収した組換えアデノウイルス中のAdexd123CANLacZの比率を求める。

【0063】本発明の方法により上記のようにして得られる、目的の外来遺伝子発現ユニットを有し、E2A遺伝子の機能が完全に欠失した本発明の組換えアデノウイルスの高力価ウイルス溶液は、適宜希釈して局所注入(中枢神経系・門脈など)、経口(腸溶剤を用いる)投与、経気道投与、経皮投与等の投与方法により感染させ、遺伝病を含む各種疾患の治療に用いることができる。

【0064】

【実施例】以下、実施例、参考例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなら限定されるものではない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis 編、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行った。また、DNA制限

酵素および修飾酵素は、宝酒造、New England Biolabs (NEB) 社、Stratagene 社又はBoehringer 社から購入し、製造者指示書に従って使用した。

【0065】実施例1 (pAdex1CAwtの構築)

① CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31の構築

CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS (Niwaら、Gene、108、193-200(1990)) をEcoRIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、SwaIリンカーとのリガーゼ反応を行った。次に、得られたプラスミドをSalIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、ClaIリンカーとのリガーゼ反応を行った。さらに、得られたプラスミドをPstIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、XhoIリンカーとのリガーゼ反応を行った。元の制限酵素部位の消失および各リンカーの挿入は各制限酵素切断の後、アガロースゲル電気泳動により確認した。

【0066】② pAdex1cの構築

(i) E1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の17%を含むプラスミド(pUAF0-17D)の調製

5型アデノウイルスDNAをS1処理して平滑末端とし、その平滑末端にBamHIリンカーを結合させ、その後HindIII消化し、目的のフラグメント(2.8kb、アデノウイルスゲノムの左側末端の8%に当たる)をアガロースゲル電気泳動で分離・回収し、BamHI/HindIII消化したpUC19のBamHI/HindIII部位へ挿入した。得られた目的のプラスミドをpUAF0-8と名づけた。

【0067】(ii) アデノウイルスDNAをHindIII消化し、アガロースゲル電気泳動で分離し、目的の3.4kbのフラグメント(アデノウイルスゲノムの左側末端の8-17%に当たる)をゲルから回収し、pUC19のHindIII部位へ挿入した(pUAF8-17と命名)。pUAF0-8の塩基番号(ここでいう塩基番号はアデノウイルスDNA由来)454番目のPvuII部位をClaIリンカーを用いてClaI部位に変換した。そして、このプラスミドをBamHI/ClaI消化し、454bpのBamHI-ClaIフラグメントをアガロースゲル電気泳動で回収した。pUAF8-17の塩基番号3328番目のBglII部位をClaIリンカーを用いてClaI部位に変換した。そしてこのプラスミドをHindIII/ClaI消化し、2.9kbのHindIII-ClaIフラグメントをアガロースゲル電気泳動で回収した。pUAF0-8由来の454bpのBamHI-ClaIフラグメントと、pUAF8-17由来の2.9kbのHindIII-ClaIフラグメントをつなぎ、pUC19のBamHI/HindIII部位へ挿入した。得られたプラスミドをpUA

F0-17Dと命名した。このプラスミドはE1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の17%を含む。

【0068】(iii)アデノウイルスゲノムのBst1107-EcoRIフラグメント(21.6kb)の調製
5型アデノウイルスDNAをBst1107とEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、目的の21.6kbのフラグメントを回収した。

【0069】(iv) アデノウイルスゲノムのEcoRI-SalIフラグメント(6.5kb)の調製
pX2S (I. Saito et. al., J. of Virology, vol. 54, p711-719, 1985)のSalI部位をSwaIリンカーを用いてSwaI部位へ変換しpX2Wを得た。pX2WをEcoRIとSwaIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、目的の6.5kbのフラグメントを回収した。

【0070】(v) シャロミド(chdRBR7-11)の調製

charomid9-11 (I. Saito & G. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 83, p8664-8668, 1986)のKpnI、SmaI、BamHIを除くため、charomid9-11をAsp718とBamHIで消化し、Klenow酵素で平滑化後、セルフライゲーションした。これを用いて形質転換し、目的のシャロミドを単離し、charomid6-11と名づけた。charomid6-11のEcoRI部位へBamHIリンカーを挿入し、得られたシャロミドをchdRBR7-11と名づけた。

【0071】(vi) pAdex1cの調製

pUAF0-17DのBamHI-Bst1107フラグメント(2.9kb)とアデノウイルスゲノムのBst1107-EcoRIフラグメント(21.6kb)とpX2WのEcoRI-SwaIフラグメント(6.5kb)をEcoRIとEcl36Iで消化したchdRBR7-11とライゲーションした。その後、in vitroパッケージングし、大腸菌DH5αへ感染させた。形質転換株から目的のフラグメントをもつものを単離し、pAdex1cと名づけた。

【0072】③ カセットコスミドpAdex1cwの構築

ClaI(20unit)で切断した後エタノール沈澱により回収したpAdex1c(1μg)と、5'末端リン酸化を施した下記の合成リンカー(1)(配列番号:2)0.01μg(SwaI、ClaI、SalI、NruI部位を含む)を混合し、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18μl)中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、SwaI(20unit)を添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからSwaI断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために

行った。次に、反応液をSpun column (Pharmacia製) にか、リンカー由来の小断片を除去した後、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量18μl) 中で一晚結合させ、セルフアニーリングにより環状化を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させ、1μlをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamHIおよびNruI同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合483bp、逆方向に挿入された場合、464bpの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdexlcw (図1) を取得した。

合成リンカー

(1) 5'-CGATTAAATCGATTGTCGACTCGCA-3'

3'-TAAATTTAGCTAACAGCTGAGCGCTGC-5'

【0073】④ カセットコスミドpAdexlcAwの構築

①で構築したプラスミドpCMwCH31をHindIIおよびClaIで同時消化し、Klenow酵素により平滑化し、5'末端リン酸化を施したPmeIリンカーとのリガーゼ反応を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、Psp1406Iを添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからPsp1406I断片を切り出し、リンカーがDNA断片の両端にそれぞれ1個連結した構造の断片を得るために行った。このあと、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、2.3kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。次に、pAdexlcwをClaIで切断した後、生じた小断片をSpun column (Pharmacia製) により除去した後のDNA断片1μgと前述の2.3kbのDNA断片0.1μgをATP、T4DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量18μl) 中で一晚結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、これの1/4量をClaIを添加し (最終容量20μl)、セルフアニーリングにより生じた環状コスミドを切断した。1μlをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamHI及びXhoI同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合483bpと4.8kb、逆方向に挿入された場合、2.7および2.5kbの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdexlpCAwを取得した。

【0074】⑤ カセットコスミドpAdexlpCAwt (細胞工学、Vol.13、No.8、P759) の構築
SwaI (20unit) で切断した後エタノール沈澱により回収したpAdexlpCAw (1μg) と、5'末端リン酸化を施した下記の合成リンカー (2) (配列

番号:3) (0.01μg) (ClaI、XbaI、SpeI、PacI、SwaI、ClaI部位を含む) を混合し、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量18μl) 中で一晚結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、PacI (20unit) を添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからPacI断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行った。次に、反応液をSpun column (Pharmacia製) にか

10 け、リンカー由来の小断片を除去した後、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量18μl) 中で一晚結合させ、セルフアニーリングによる環状化を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた1μlをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をXbaIおよびXhoI同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合552bp、逆方向に挿入された場合、568bpの断片を生じる。これを確認することにより目的とするカセットコスミドpAdexlpCAwt (図2) を取得した。

合成リンカーの構造

(2) 5'-ATCGATTCTAGACTAGTTTAATTAATTTAAATCGAT-3'
3'-TAGCTAAGATCTGATCAATTAATTAATTTAGCTA-5'

【0075】実施例2 (loxP挿入コスミドの構築)

① pA60X99Xの作製

pAdexlpCAwt (0.5μg) をBamHI (15unit) を含む反応系20μl中で切断した後、熱処理 (70℃、15分間) によりBamHIを失活させた。次にその1/4量を用いリガーゼ反応buffer中でATP、T4DNAリガーゼを加え、最終容量20μlで一晚結合させた。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA60X99Xを得た。

【0076】② pA60X99の作製 (アデノウイルス以外のXbaI部位を除去する)

pA60X99X (5μg) をXbaI (10unit) を含む反応系50μl中で5分間反応させ、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、2ヶ所のXbaI部位のうち1ヶ所のみで切断された23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。次に、この断片0.2μgをKlenow酵素 (宝酒造製) 5unitを含む反応系50μl中で反応させ両末端を平滑化し、さらに、これの1/5量、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量20μl) 中で一晚結合させた。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製した。これらのプラスミドDNAをBsrGIおよびXb

a I で同時消化し、6.2 kb の断片を生じる、すなわち図1の構造を有するプラスミド pA60X99 (図3) を得た。

【0077】③ pA2L60X99 の作製 (BsrGI 部位への loxP の挿入)

pULL2r (30 μg) を XhoI (150 unit) を含む反応系 125 μl 中で切断した後、熱処理 (70℃、15 分間) により XhoI を失活させた。続いて Klenow 酵素 (宝酒造製) 12 unit を含む反応系中で両末端を平滑化し、その後フェノール:クロロホルム (1:1) 処理を施した後、エタノール沈澱した。沈澱物を遠心分離により取得し、10 mM トリス塩酸 (pH 7.5) に 1 mM の EDTA を添加した溶液 (TE) 60 μl に溶解した。次に、これの 1/2 量と 5' 末端リン酸化 KpnI リンカー (宝酒造製) 0.2 μg、ATP および T4 DNA リガーゼを含むリガーゼ反応液 (最終容量 50 μl) 中で一晩結合させた。次に、熱処理 (70℃、15 分間) によりリガーゼを失活させた後、Asp718 (100 unit) を含む反応系 80 μl 中で消化した。反応混液をアガロースゲル電気泳動し、loxP を含む 64 bp の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収した。

【0078】なお、上記の pULL2r は以下のようにして調製した。pUC119 (宝酒造製) を制限酵素 Eco1136II で切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した後、末端に MluI 部位および XhoI 部位を有しこれが連結すると NruI 部位を生じるように設計されている loxP 配列を含む下記の合成 DNA 断片 (配列番号: 4) との ligation 反応を行い該合成 DNA 断片が 2 つ挿入されたプラスミド pULL2r を得た。

5'-CGAACGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCG AGTCG-3'

3'-GCTTGCGCATATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATAGAGC TCAGC-5'

(下線部分の配列が loxP 部位である。)

【0079】一方、プラスミド pA60X99 (10 μg) を BsrGI (50 unit) を含む反応系 50 μl 中で切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8 kb の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収した。この DNA 断片 0.5 μg と前述の loxP を含む 64 bp の DNA 断片 0.005 μg、ATP および T4 DNA リガーゼを含むリガーゼ反応液 (最終容量 25 μl) 中で一晩結合させた。これの 1/2 量に滅菌水、BsrGI 反応 buffer を加えて 18 μl としてから、70℃ で 10 分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。さらに、20 unit の BsrGI を加え (最終容量 20 μl) 37℃ で 1 時間反応させることによりセルフアニーリングにより生じた環状の pA60X

99 を切断した。次いでこの反応混液 10 μl を用いて大腸菌 DH5α を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド DNA を調製した。

【0080】挿入された loxP の方向を確認するため、ApaI と MluI の同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動した。目的とする方向に挿入された場合、366 および 219 bp、逆方向に挿入された場合、334 および 251 bp の断片が生じる。また、NruI で消化した場合、目的とする方向に挿入された場合 573 bp、逆方向に挿入された場合、533 bp の断片が生じる。さらに、DraI と KpnI で同時消化した場合、目的とする方向に loxP が 1 つ挿入された場合 320 bp、2 つ挿入された場合、384 bp の断片が生じる。これら 3 種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向に loxP が 1 つ挿入された目的のプラスミド pA2L60X99 (図4) を取得した。

【0081】④ pA2L3L6099 の作製 (XbaI 部位への loxP の挿入)

pULL2r (20 μg) を XhoI (100 unit) を含む反応系 100 μl 中で切断した後、熱処理 (70℃、15 分間) により XhoI を失活させた。続いて Klenow 酵素 (宝酒造製) 8 unit を含む反応系において両末端を平滑化し、その後フェノール:クロロホルム (1:1) 処理を施した後、エタノール沈澱した。沈澱物を遠心分離により取得し、TE 30 μl に溶解した。これの全量と 5' 末端リン酸化 SpeI リンカー (宝酒造製) 0.4 μg、ATP および T4 DNA リガーゼを含む反応液 (最終容量 50 μl) 中で一晩結合させ、70℃ で 10 分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。さらに、SpeI (54 unit) を加え消化した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、loxP を含む 64 bp の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収した。

【0082】一方、pA2L60X99 (10 μg) を、XbaI (100 unit) を含む反応系 50 μl において切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8 kb の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA を回収した。この DNA 断片 0.5 μg と前述の loxP を含む 64 bp の DNA 断片 0.005 μg、ATP および T4 DNA リガーゼを含む反応液 (最終容量 16 μl) 中で一晩結合させた。これに 5 倍希釈した TE 14 μl を加え、70℃ で 10 分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。次いでこれの 1/4 量に 20 unit の XbaI を添加し (最終容量 20 μl)、セルフアニーリングにより生じた環状の pA2L60X99 を切断した。この反応混液 10 μl を用いて大腸菌 DH5α を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド DNA を

調製した。

【0083】挿入された loxP の方向を確認するため、 BglII と MluI の同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動した。目的とする方向に挿入された場合、366および503bp、逆方向に挿入された場合、398および471bpの断片が生じる。また、 ApaI と MluI で同時消化した場合、目的とする方向に挿入された場合660bp、逆方向に挿入された場合、628bpの断片が生じる。 EcoNI と MluI で消化した場合、目的とする方向に挿入された場合311bp、逆方向に挿入された場合、343bpの断片が生じる。さらに、 HpaI と SacI で同時消化した場合、目的とする方向に loxP が1つ挿入された場合397bp、2つ挿入された場合、461bpの断片が生じる。これら4種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向に loxP が1つ挿入された目的のプラスミド pA2L3L6099 (図5)を取得した。

【0084】⑤ pAdex2L3LCAwt の作製 pAdex1CAwt (10 μg) を、 Csp45I (40unit) を含む反応系100 μl 中で切断し、次いで、同反応液中に BamHI (30unit)、さらに EcoRI (40unit) を順次添加した。21kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。なお、 Csp45I および EcoRI による切断は21kbの BamHIDNA 断片を回収する際、他の断片が混入するのを防ぐためである。

【0085】 pA2L3L6099 (5 μg) を、 BamHI (30unit) を含む反応系50 μl 中で切断した後フェノール:クロロホルム (1:1) 処理を施し、水層をTEで平衡化した SephadexG25 によりゲル濾過した。回収したDNA断片0.5 μg と前述の21kbのDNA断片0.5 μg 、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量18 μl) 中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、1 μl をイン・ビトロ・パッケージングに用いた。

【0086】即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバックXL (Stratagene社製) を1/4スケールで用い、残りは-80℃に凍結した。ギガバックXLは42kb以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなったコスミドをある程度選択することができる。本実験では、10個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的のクローン (ウイルスゲノムが正しく連結されたクローン) を容易に得ることができた。コスミドの扱い方については、常法 (斎藤 泉他、実験医学: 7:183-187, 1989) に従って行った。

【0087】パッケージングされたコスミドを大腸菌DH5 α (GibcoBRL) に感染させた。即ち、3枚

の Ap^+ (アンピシリン添加) 寒天プレートと5mlの Ap^+LB (pool) にそれぞれ1/200量、1/20量、1/2量、残り全量を接種し、一晩培養した。poolのminiprepDNAを抽出・調製し、制限酵素 DraI 切断によりインサートがはいったものの割合を調べた。コロニーは丸ごと寒天ごと取り1.5mlの Ap^+LB で、一晩培養し、miniprepDNAを調製した。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造を DraI 切断により確認した。目的とする方向に挿入された場合891bp、逆方向に挿入された場合1.4kbの断片を生じる。これにより目的とするカセットコスミド pAdex2L3LCAwt を取得した。

【0088】実施例3

(アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体 (Ad5dlX DNA-TPC および $\text{Adex1CANLacZ DNA-TPC}$) の調製) アデノウイルスDNAとしては、 Ad5dlX (I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (1985)) または Adex1CANLacZ を用いた。特開平8-84589号公報14欄12行~15欄8行に記載の方法で、アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体の調製を行った。得られた Ad5dlX および $\text{Adex1CANLacZ DNA-TPC}$ を、第3ステップの組換えアデノウイルス作成のため、充分量の AgeI で2時間切断し、 SephadexG25 カラムでゲル濾過後、-80℃に保存した。

【0089】なお、DNA-TPCは制限酵素による切断、透析、ゲル濾過はできるが電気泳動・フェノール処理・エタノール沈澱はできない。濃縮法は塩化セシウム平衡遠心分離しかないのでなるべく濃厚状態に保った。10Rouxの感染細胞から約300 μg 程度のDNA-TPCを得ることができた。一部を分取し、泳動用 BPB buffer を10 μl 加えた後に、1 μl のプロテイナーゼK (10mg/ml) を加えて37℃で10分間反応させて末端蛋白を消化した。フェノール抽出し、上清をアガロースゲル電気泳動で分離し、完全切断を確認した。 AgeI 切断DNA-TPC中の制限酵素 buffer を、遠心ゲル濾過によって除いた後、分注し-80℃に保存した。

【0090】実施例4

(loxP 挿入組み換えアデノウイルス (Ad5dlX2L3L または Adex2L3LcanLacZ) の作製) なお、 NLacZ は大腸菌 LacZ 遺伝子のN末端にSV40の核移行シグナルを付加したものである。

① 10%FCS添加DMEで培養した293細胞の6cm、10cmシャーレ各1枚用意した。

② 発現ユニットを組み込んだ loxP を挿入したコスミド pAdex2L3LCAwt DNA の8 μg と AgeI で切断した Ad5dlX DNA-TPC または AgeI で切断した Adex1CANLacZ DNA

10

20

30

40

50

ーTPCの1 μ gを混合し、セルフエクト（ファルマシア製）キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行った。6cmシャーレのメディウムの上から混合液を滴下し、培養を続けた。一晚培養（約16時間）し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラーゲンコート96穴3枚（原液・10倍希釈・100倍希釈）に、5%FCS添加DMEを用い、各ウェル当たり0.1mlでまき直した。細胞数が各プレートで大きく変わらないように、希釈2枚分には10cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播いた。

【0091】③ 3～4日後と8～10日後に、各ウェルに50 μ lの10%FCS添加DMEを加えた。293細胞がやせてきたら早めに加えた。ウイルスが増殖し細胞が死滅したウェルが7～20日の間に現れた。ウェルの細胞が完全に死滅するごとに滅菌パスツールピペットで培養液（死細胞ごと）を滅菌した1.5mlチューブに無菌的に移して、ドライアイスで急凍して-80℃に保存した。

④ 15～25日で判定は終了した。比較的遅く細胞が死んだウェルから回収した培養液チューブを約10個選び、超音波破砕後、5000rpm10分遠心分離して得られた上清を1次ウイルス液（first seed）として-80℃に保存した。早めにウイルス増殖が起こったウェルは複数のウイルス株の混合感染の可能性が高いからである。

【0092】⑤ 24穴プレートに293細胞を用意し、5%FCS-DME（0.4ml/ウェル）と1次ウイルス液10 μ lをそれぞれ2ウェルずつ添加した。
⑥ 約3日で細胞が完全に死滅したら、1ウェルは1次ウイルス液作製と同様に超音波破砕と遠心分離で上清を得、これを2次ウイルス液（second seed）として-80℃に保存した。他の1ウェルの死滅した細胞を5000rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てて細胞だけを-80℃に保存した（セルパック）。10種類のウイルス株のセルパックが集まったら以下の方法で感染細胞の全DNAを抽出した。セルパックには、400 μ lのcell DNA用TNE（50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA）、4 μ lのproteinaseK（10mg/ml）および4 μ lの10%SDSを加えた。

【0093】⑦ 50℃で1時間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出2回、ついでエタノール沈殿により得られた核酸をRNAseを20 μ g/ml含む50 μ lのTEに溶かした。その15 μ lを発現ユニットを切断する酵素の中で認識配列にCGを含む酵素であるXhoIで切断し、発現コスミドカセットのXhoI切断と共に、15cm位の長さのアガロースゲルで一晚電気泳動を行い、パターンを比較した。XhoIは挿入したloxP配列内に認識部位があるので、loxPが2個挿入された切断パターンを示す

クローンを選択する。説明できないバンドが薄く見えるクローンは、欠失のあるウイルスとの混合の可能性があるので廃棄した。

【0094】実施例5

（Cre発現バキュロウイルスの作製）

（1）Sf細胞の培養

Sf細胞（ATCC CRL1711）は、Grace's 培地（Gibco社）に13%のBacto Tryptose Broth（Difco社）を2%とウシ胎児血清を10%添加した培地中、26.5℃で培養した。必要に応じて無血清培地Ex-cell 400（LRHバイオサイエンス社）なども使用可能である。培養ボトルはガラス製のボトル（フラット社製MAボトル）中で行い、継代にはトリプシンを使用せず、泡立ないようにボトルを揺すって細胞を剥がした。

【0095】（2）バキュロウイルスDNAの調製
トランスフェクションに用いるバキュロウイルスDNAは野生型ではなく、LacZ遺伝子を組み込んだものをLacZ遺伝子領域内で1ヶ所SauIで切断して直鎖状にしたものを用いた。これにより、組換えウイルスの出現効率を飛躍的に向上することができるばかりでなく、組換えウイルスの選別が容易にできた（図7）。LacZ遺伝子を組み込んだ組換えウイルスAcRP23lacZ（LacZ遺伝子を多角体プロモーターの下流に接続、ポッセ博士（Dr. R. D. Possee, NERC Institute of Virology, UK）から分与）感染後、2～3日の培養液（200ml）を5000 \times g、10分間遠心分離し、その上清液を25000 \times g、60分間遠心分離してペレットを回収し、次にこれを50%のショ糖クッションにのせ、ウイルスをペレットダウンし、1.6mlのTE緩衝液（pH8.0）に浮遊後、0.4mlのlysis緩衝液（10% sodium N-lauroyl sarcosinate, 1mM EDTA）を加え、60℃で20分間加熱した。これを臭化エチジウム溶液〔TE緩衝液（pH8.0）中に100 μ g/ml臭化エチジウムを溶解〕で溶かした54%CsClに重層し、100000 \times gで18時間遠心分離した。開鎖状、閉鎖状の2本のバンドが認められるが、両方とも回収し、水飽和ブタノールで臭化エチジウムを除き、TE緩衝液で一晩0℃で透析した。次に、この精製ウイルスDNAをSauIで切断して直鎖状にした。

【0096】（3）Cre発現バキュロウイルスの作製
CAGプロモーターのクローニング部位にCre遺伝子を挿入したカセットコスミド（特開平8-84589号公報）をPmeIで消化し発現ユニットを含む断片を回収した。ベクターpAcYM1（J. Gen. Virol. 68, 1233-1250, 1987）（図6）をEcoRVとBamHIで消化し、ポリヘドリンのプロモーター領域を取り除き、Klenow酵素を用いて平滑化し、さらにアルカリホスファターゼ処理を施した後、前述の断片と混合し、T

4リガーゼ（宝酒造）を用いてリガーゼ反応を行った。さらに、この反応混液を用いて大腸菌JM109株（ATCC53323）を形質転換した。アンピシリン（100μg/ml）を添加したLB寒天プレートから形質転換株を拾い、目的のプラスミドを得た。このプラスミド1μgと（2）で得た直鎖状バキュロウイルスDNA20ngを滅菌水を加えて8μlにした。それに滅菌水で2倍希釈したりボフェクチン（Gibco社）を等量加えて室温で15分間静置後、血清無添加のGrace's培地（Gibco社）に置き換えた1×10⁶個のSf細胞へ接種し培養した。24時間後、通常の10%FCS添加培地に交換した（「実験医学別冊」バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社（1994）、142～150頁）。

【0097】（4）組換えウイルスの選別

トランスフェクションして3日後、1×10⁶個のSf細胞を35mmのディッシュに用意し、適当に希釈したウイルス液を接種する。1時間吸着後、ウイルス液を捨て、重層寒天培地を2ml加える。重層した培地が固まった後、1mlの培養液をさらに重層した。27℃で3～4日間培養後、0.01%ニュートラルレッドおよび0.04% X-galを添加したPBSを1.0ml加えて染色した後、白いブランクをキャピラリーで抜き取り（親ウイルスは青色）、少量の培養液に浮遊させた。これをよく攪拌してウイルスを溶出させ、軽く遠心分離後、上清液を希釈してブランクアッセイを行った。同一ディッシュ中に青いブランクがなくなるまで繰り返し、純化したクローンAcCANCReを得た（図7）。

【0098】（5）組換えバキュロウイルスAcCANCReの大量調製

純化したウイルスAcCANCReを次第にスケールアップして増やし、高い感染価のストックウイルスを調製した（10⁷～10⁸ pfu/ml）。次に、実施例5（2）に記述した方法により、組換えバキュロウイルスAcCANCReを精製した。即ち、組換えウイルス感染後、2～3日の培養液を5000×g、10分間遠心分離し、その上清を25000×g、60分間遠心分離してペレットを回収し、次にこれを50%のショ糖クッションにのせ、ウイルスをペレットダウンし、適量のTE緩衝液（pH8.0）に懸濁した。このウイルス液は4℃で数年間保存が可能である。

【0099】実施例6

（E2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの作製と構造確認）組み換えアデノウイルスAdex2L3LCANLacZおよびCre発現バキュロウイルスAcCANCReをそれぞれmoi=10および100で293細胞に感染させ、培養を行った。なお、Cre発現バキュロウイルスAcCANCReが産生するNCReは、NLacZと同様、SV40の核移行シグナルをCreの

N末端に付加したものである。4日目に細胞を回収し、前述の方法によりDNAを調製した。loxPで挟まれた領域（E2A遺伝子を含む）が切り出された構造を有するAdexd123CANLacZの生成を次の方法で確認した。

【0100】SmaI消化

SmaI消化の後、ゲル電気泳動した結果、loxPで挟まれた領域が切り出されて生じる4.7kbの断片が認められた。このバンドとAdex2L3LCANLacZ、およびAdexd123CANLacZにおいて共通して見られる4.45kbのバンドの濃さの比較から、回収した組換えアデノウイルス中の約10%がAdexd123CANLacZであることが分かった。

【0101】実施例7

（LacZ発現バキュロウイルスAcCALacZ（CAGプロモーター制御下）の作製および293細胞への導入）

（1）バキュロウイルスDNAの調製

実施例5（2）と同様の方法でバキュロウイルスDNAを調製した。

【0102】（2）組換えバキュロウイルスAcCALacZの作製

CAGプロモーターのクローニング部位にLacZ遺伝子を挿入したカセットコスミドpAdex1CALacZ（特開平8-84589号公報）をPmeIで消化し発現ユニットを含む断片を回収した。ベクターpAcYM1（J. Gen. Virol. 68, 1233-1250, 1987）（図6）をEcoRVとBamHIで消化し、ポリヘドリンのプロモーター領域を取り除きKlenow酵素を用いて平滑化し、さらにアルカリホスファターゼ処理を施した後、前述の断片と混合し、T4リガーゼ（宝酒造）を用いてリガーゼ反応を行った。さらに、この反応混液を用いて大腸菌JM109株（ATCC53323）を形質転換した。アンピシリン（100μg/ml）を添加したLB寒天プレートから形質転換株を拾い、目的のプラスミドを得た。このプラスミド1μgと（1）で得た直鎖状バキュロウイルスDNA20ngを滅菌水を加えて8μlにした。それに滅菌水で2倍希釈したりボフェクチン（Gibco社）を等量加えて室温で15分間静置後、血清無添加のGrace's培地（Gibco社）に置き換えた1×10⁶個のSf細胞へ接種し培養した。24時間後、通常の10%FCS添加培地に交換した。図7においてCre遺伝子のかわりにLacZ遺伝子を用いた。

【0103】（3）組換えウイルスの選別

実施例5（4）と同様の方法で、純化したクローンAcCALacZを得た。

【0104】（4）LacZ発現バキュロウイルスAcCALacZの293細胞への導入

96穴プレートに293細胞をまき、1ウエルあたり約10⁵細胞になった時点でLacZ発現バキュロウイルスA

31

c C A L a c Z を moi 1、10、100、500 になるように添加し、37℃で1時間インキュベートした。最終容量100μLになるように培地を添加し、37℃で2日間インキュベートした後、X-gal染色を行った。顕 *

moi	1	10
効率 (%)	3	40

【0105】

【発明の効果】本発明の組換えバキュロウイルスを使用することにより、目的の組換えアデノウイルスの分離、精製が容易になる。

【0106】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

ATAACTTCGT ATAGCATACA TTATACGAAG TTAT

【0107】配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CGATTAAAT CGATTGTCGA CTCGCGA

【0108】配列番号：3

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATCGATTCTA GACTAGTTTA ATTAATTTAA ATCGAT

【0109】配列番号：4

配列の長さ：52

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（一部Genomic DNA を含む任意の ◆

配列

CGAACGCGTA TAACTTCGTA TAGCATACAT TATACGAAGT TATCTCGAGT CG

【0110】配列番号：5

配列の長さ：119

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（一部Genomic DNA を含む任意の ◆

配列

CATGTAATTT AAATCTCGAG ATAACTTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATACGCGT 60
 ATTTAAATGT AAAAATAATG TACTAGAGAC ACTTTCAATA AAGGCAAATG CTTTATTT 119

【0111】配列番号：6

配列の長さ：115

32

* 微鏡下で青色に染まっている細胞と染まっていない細胞を数えることによりLacZ発現バキュロウイルスベクター導入効率を算出した。

100	500
100	100

※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

10 ハイポセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

起源：大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

※

34

☆配列の種類：他の核酸（合成された任意のDNA）

ハイポセティカル配列：YES

20 アンチセンス：NO

配列の特徴

★ 特徴を決定した方法：S

27

☆配列の種類：他の核酸（合成された任意のDNA）

ハイポセティカル配列：YES

アンチセンス：NO

配列の特徴

☆ 特徴を決定した方法：S

36

◆ DNA)

ハイポセティカル配列：YES

アンチセンス：NO

起源：大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

52

DNA)

ハイポセティカル配列：YES

アンチセンス：NO

起源：大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

60

119

配列の型：核酸

50 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（一部Genomic DNAを含む任意のDNA）

ハイボセティカル配列：YES

配列

GTAACTCTC GGGTGATTAT TTACCCAC CCTTGCCGTC TCGCCGATT TAAATCTCGA 60
GATAACTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTATACGCG TATTTAAATC CGTTT 115

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、コスミドpAdexlcwの構造を示す概念図である。

【図2】図2は、コスミドpAdexlCAwtの構造を示す概念図である。

【図3】図3は、プラスミドpA60X99の構造を示す概念図である。

【図4】図4は、プラスミドpA2L60X99の構造を示す概念図である。

※

* アンチセンス：NO

起源：大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

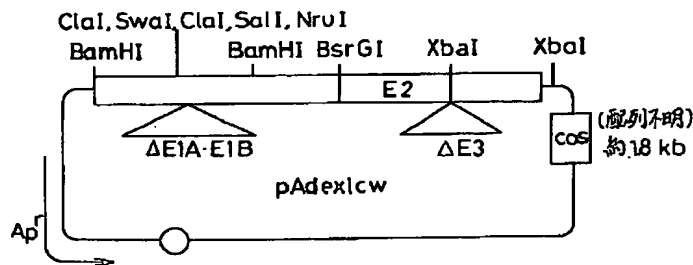
* 特徴を決定した方法：S

※【図5】図5は、プラスミドpA2L3L6099の構造を示す概念図である。

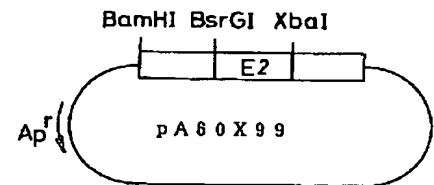
10 【図6】図6は、プラスミドpAcYM1の構造を示す概念図である。

【図7】図7は、トランスファーベクターの作製とLacZを組み込んだ直鎖状バキュロウイルスDNAを用いる組換えバキュロウイルスの選別方法を示す概略図である。

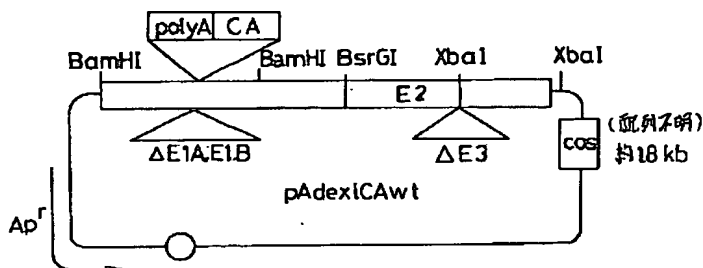
【図1】



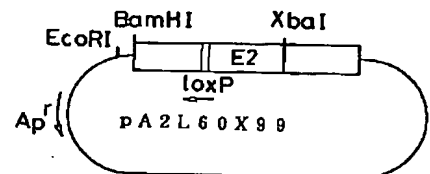
【図3】



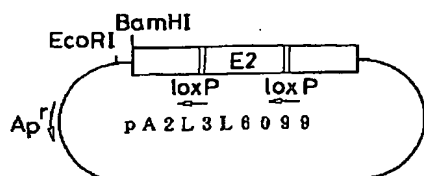
【図2】



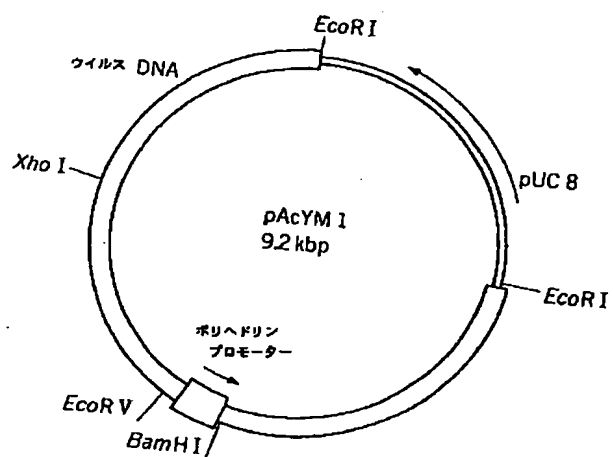
【図4】



【図5】



【図 6】



β-gal 組換えウイルス

DNA抽出

AcRP23lacZ

多角体

カプセル

lacZ

遺伝子

SauI 切断

SauI

直鎖状ウイルスDNA

トランスファクター

S. frugiperda 細胞

トランスフェクション

上清をブランクアッセイ

X-gal の添加

青色プラーク (親ウイルス)

白色プラーク (組換えウイルス)

ブランク純化

スケールアップ

直鎖状ウイルスDNA

トランスファクター

プロモーター

バックター

pAcYM1

EcoRV

BamHI

CAG カプセル

及 UCre を含む

PmeI 断片

外来遺伝子

技術表示箇所

(72)発明者 宮村 達男
東京都杉並区浜田山4丁目21番22-113号